

金属离子对法夫酵母产虾青素影响的研究

倪辉^{1,2} 何国庆¹ 杨远帆² 蔡慧农²

1(浙江大学农业生物系统工程与食品学院,杭州,310029)

2(集美大学生物工程学院,厦门,361021)

摘要 为了研究金属离子对法夫酵母产虾青素的影响并优化出有利于法夫酵母产虾青素的金属离子,用单因子实验方法研究不同离子对法夫酵母产虾青素的影响并用正交实验方法对金属离子进行了配比优化。在培养基中添加 Zn^{2+} 和 Mn^{2+} 能增加细胞干重,在培养基中添加 Zn^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Mn^{2+} 和 Cu^{2+} 能使培养液中虾青素的浓度增加,在培养基中添加 Fe^{3+} 和 Cu^{2+} 能使细胞中虾青素的含量增加。在培养基中添加 $3 \mu\text{mol/L}$ 的 Mn^{2+} 、 $1 \mu\text{mol/L}$ 的 Zn^{2+} 、 $1 \mu\text{mol/L}$ 的 Fe^{3+} 、 $5 \mu\text{mol/L}$ 的 Cu^{2+} 有利于法夫酵母虾青素的合成,用这些金属离子批次培养法夫酵母,总细胞得率为 0.349 g/g (葡萄糖),总虾青素得率为 0.266 mg/g (葡萄糖),细胞内虾青素最高含量为 0.81 mg/g 。

关键词 金属离子,法夫酵母,虾青素,发酵

虾青素又名虾黄质,龙虾壳色素,化学名称为 3, 3'-二羟基- β , β -胡萝卜素-4, 4'-二酮(3, 3'-dihydroxy- β , β -carotene-4, 4'-dione),分子式 $C_{40}H_{52}O_4$,是生物界广泛存在的具有抗氧化,抗衰老,抗肿瘤,增强免疫等多种生物学功能的类胡萝卜素类物质。不仅具有独特的着色功能,而且还具有重要的生理功能,近几年的研究表明,虾青素在促进抗体的产生、增强宿主的免疫功能、抗氧化、清除自由基等方面均强于 β -胡萝卜素,是一种极具潜力的类胡萝卜素,在饲料、食品、化妆品及医药等领域有着广阔的应用前景^[1~4]。

虾青素的生产方法有化学合成、从甲壳类动物中提取以及微生物发酵等方法。前两种方法都有很大的局限性,不能满足日益增长的应用需要,故急需寻求新的虾青素生产方法。法夫酵母是一种极具产业化前景的天然虾青素资源^[5],本实验室经过长期的研究积累,诱变筛选出了 1 株高产虾青素的法夫酵母菌株 7B12,为了进一步考察该菌株的生产性能,有必要研究该菌株产虾青素的最适宜条件。以此为出发点,本实验主要研究金属离子对该菌株的影响,并优化出适于虾青素积累的金属离子条件。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 菌 种

法夫酵母 7B12 菌株,本实验室诱变分离并保存。

1.1.2 培养基

斜面培养基:麦汁培养基。

液体种子培养基(g/L):葡萄糖 10、麦汁 3、蛋白陈 5、酵母膏 5、pH6.0,121℃ 灭菌备用。

液体发酵基础培养基(g/L):葡萄糖 20、 KH_2PO_4 1、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5、 $CaCl_2 \cdot H_2O$ 0.1、 $(NH_4)_2SO_4$ 5、酵母膏 1、pH6.0,灭菌备用。

1.1.3 主要试剂

葡萄糖、 KH_2PO_4 、 $MgSO_4$ 、3, 5-二硝基水杨酸、二甲亚砷、丙酮、甲醇等试剂,均为分析纯;甲醇、乙腈、四氢呋喃等液相分析用试剂,为色谱纯。

1.1.4 主要仪器

FA1004 型电子天平(上海精科天平)、HWY-111 恒温培养摇床(上海智城分析仪器制造有限公司)、真空冷冻干燥机(美国 Svant 公司产品)、手提式压力蒸汽灭菌器(上海博迅实业有限公司医疗设备厂)、立式圆形蒸汽压力灭菌器(武汉市黄陂医疗化工设备厂)、1525 型高效液相色谱仪(美国 Waters 公司)、低 LXJ-IIB 大容量多管离心机(上海安亭科学仪器总厂)、101-3B 型电热鼓风干燥箱(上海市实验仪器总厂)、7230 分光光度计(厦门分析仪器厂)、HH-6 数显恒温水浴锅(金坛市富华仪器有限公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 还原糖的测定

DNS 法^[6]。

1.2.2 生物量的测定

发酵液在 3000 r/min 的条件下离心 5 min ,弃上清后将得到的菌体用无菌水洗涤 3 次,最后将菌体冷冻干燥至恒重。

1.2.3 类胡萝卜素提取

二甲亚砷法^[7]。

第一作者:博士研究生。

收稿日期:2005-05-11

1.2.4 虾青素测定

高效液相色谱法。

1.2.5 斜面种子制备

从原种中接1环菌种到麦汁斜面培养基上,22℃培养96 h。

1.2.6 种子培养

250 mL三角瓶中装入种子培养基25 mL,121℃,20 min 湿热高压灭菌后接种,在22℃,225 r/min 振荡培养2d^[8]。

1.2.7 摇瓶发酵

以10%的接种量接种液体种子于装有25 mL摇瓶培养基的250 mL三角瓶中,在摇床上以225r/min 振荡培养72 h。

1.2.8 发酵罐批式培养

5 L发酵罐(德国Bio Braun Biotech International公司)中配制3.5 L培养基(装料系数0.7),121℃灭菌1 h后以10%的接种量接种,22℃、190 r/min、2.1 VVM、pH5.0 培养5 d。

2 实验结果

2.1 不同金属离子对法夫酵母产虾青素的影响

在法夫酵母培养液中分别添加1 μmol/L的Cu²⁺、Mn²⁺、Cd²⁺、Zn²⁺、Fe²⁺、Fe³⁺和Co²⁺,以10%的接种量接种培养72 h,分析检测培养液中的生物量,虾青素浓度及法夫酵母细胞中虾青素的浓度,结果如图1。

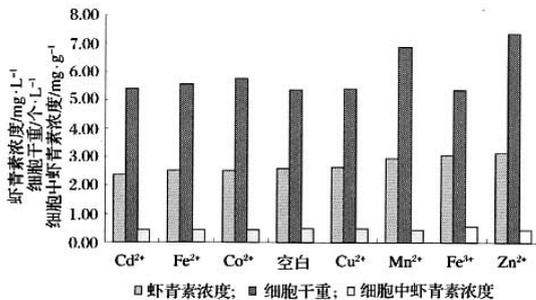


图1 不同金属离子对法夫酵母培养的影响

在培养液中添加1 μmol/L的Zn²⁺,细胞干重和培养液中虾青素的浓度都最大,其值分别达到了7.38 g/L和3.18 mg/L;在培养液中添加1 μmol/L的Fe³⁺时,细胞内的虾青素含量达到最大值(0.58 mg/g干菌体)。

2.2 金属离子配比正交实验

根据前面的实验结果,选取Mn²⁺,Zn²⁺,Fe³⁺,

Cu²⁺等4种金属离子,按表1所示的因素水平进行正交实验,以期优化出最有利于法夫酵母生产合成虾青素的金属离子配比,实验设计及结果如表2所示。

表1 金属离子正交实验因素水平表 μmol/L

水平	Mn ²⁺ (A)	Zn ²⁺ (B)	Fe ³⁺ (C)	Cu ²⁺ (D)
1	1	1	1	1
2	3	3	3	3
3	5	5	5	5

表2 金属离子配比正交实验设计与结果

序号	Mn ²⁺	Zn ²⁺	Fe ³⁺	Cu ²⁺	细胞	发酵液中虾	细胞中虾
					干重	青素浓度	青素浓度
					/g·L ⁻¹	/mg·L ⁻¹	/g·g ⁻¹
1	1	1	1	1	7.10	4.14	0.58
2	1	2	2	2	7.39	3.63	0.49
3	1	3	3	3	7.04	3.04	0.43
4	2	1	2	3	7.74	4.41	0.57
5	2	2	3	1	7.09	3.62	0.51
6	2	3	1	2	8.24	3.74	0.45
7	3	1	3	2	7.24	3.72	0.51
8	3	2	1	3	6.94	3.70	0.53
9	3	3	2	1	6.88	3.26	0.47

表3 添加金属离子正交实验的细胞干重极差分析表

	A(Mn ²⁺)	B(Zn ²⁺)	C(Fe ³⁺)	D(Cu ²⁺)
X ₁	7.18	7.36	7.29	7.02
X ₂	7.69	7.14	7.34	7.62
X ₃	7.02	7.38	7.12	7.24
极差 R	0.67	0.25	0.22	0.60

当实验组合为A₂B₃C₁D₂时,细胞干重有最大值8.24 g/L,当实验组合为A₃B₃C₂D₁时,细胞干重出现最小值6.88 g/L;当实验组合为A₂B₁C₂D₃时,培养液中的虾青素浓度有最大值4.41 mg/L;当实验组合为A₁B₃C₃D₃时,培养液中虾青素浓度最小;当实验组合为A₁B₁C₁D₁时,细胞中虾青素含量最大,而实验条件为A₁B₃C₃D₃时,细胞中虾青素浓度最小。表3是金属离子对细胞干重的极差分析表,比较各列的极差值R值,可以看出R_A>R_B>R_C>R_D,即在实验所设定的因素中,Mn²⁺对细胞干重的影响最大,而Fe³⁺的影响最小,比较各列的均值,得到针对法夫酵母细胞生长的最佳因素位极组合为A₂B₃C₂D₂。

表4 添加金属离子正交实验的虾青素极差分析表

	A(Mn ²⁺)	B(Zn ²⁺)	C(Fe ³⁺)	D(Cu ²⁺)
X ₁	3.60	4.09	3.86	3.67
X ₂	3.92	3.65	3.77	3.69
X ₃	3.56	3.34	3.46	3.71
极差 R	0.36	0.74	0.40	0.05

表4是金属离子配比正交实验结果针对发酵液

中虾青素浓度的极差分析,比较各列的极差值R值,可以看出 $R_B > R_C > R_A > R_D$,即在实验所设定的因素中, Zn^{2+} 对虾青素的积累影响最大,其次是 Fe^{3+} ,再次是 Mn^{2+} ,最小的是 Cu^{2+} ,比较表4各列的均值,得到最有利于法夫酵母产虾青素的最佳位极组合为 $A_2B_1C_1D_3$ 。

表5是针对法夫酵母细胞内虾青素浓度的极差分析结果, Zn^{2+} 浓度对细胞内虾青素浓度的影响最大,其他3种金属离子的浓度对细胞内虾青素影响的效应值基本相等,比较各列的均值得出能提高细胞内虾青素含量的最优位极组合是 $A_2B_1C_1D_1$ 。

表6 金属离子添加验证实验结果

	Mn^{2+} $/\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	Zn^{2+} $/\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	Fe^{3+} $/\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	Cu^{2+} $/\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	细胞干重 $/\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	发酵液中虾青素 $/\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$	细胞中虾青素 $/\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$
$A_2B_3C_2D_2$	1	5	3	3	8.43	3.08	0.37
$A_2B_1C_1D_3$	3	1	1	5	7.01	5.24	0.75
$A_2B_1C_1D_1$	3	1	1	1	6.84	5.08	0.74

金属离子组合 $A_2B_3C_2D_2$ 培养法夫酵母72 h后生物量为8.43 g/L,细胞总产率为0.422 g/g,但发酵液及细胞中虾青素含量偏低。金属离子组合 $A_2B_1C_1D_3$ 培养法夫酵母72 h后,生物量为7.01 g/L,细胞总产率为0.351 g/g,发酵液及细胞中虾青素浓度都是最高,分别为5.24 mg/L和0.75 mg/g。而用 $A_2B_1C_1D_1$ 的金属离子组合培养法夫酵母,生物量最小,但发酵液及细胞中虾青浓度都较大,接近 $A_2B_1C_1D_3$ 的组合。

2.4 优化金属离子组合批式培养法夫酵母7B12的实验结果

为了在批式发酵中获得较高的虾青素发酵浓度,采用 $A_2B_1C_1D_3$ 的金属离子组合培养法夫酵母,实验结果如图2所示。

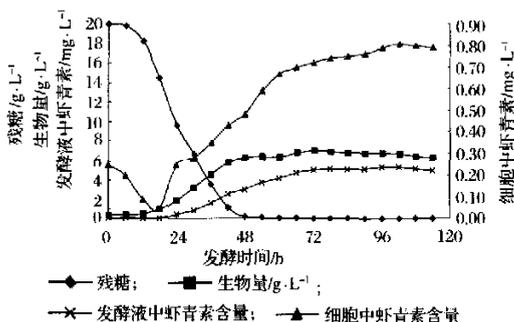


图2 添加优化的金属离子组合批式发酵法夫酵母曲线

0~18 h,法夫酵母处于延滞期;18~48 h,法夫酵母处于对数生长期,生物量及发酵液中虾青素都快

表5 添加金属离子正交实验的细胞内

虾青素含量极差分析表

	A(Mn^{2+})	B(Zn^{2+})	C(Fe^{3+})	D(Cu^{2+})
X_1	0.50	0.55	0.52	0.52
X_2	0.54	0.51	0.51	0.48
X_3	0.50	0.45	0.48	0.51
极差R	0.04	0.10	0.04	0.04

2.3 验证实验

采用最有利于法夫酵母生长、可提高发酵液中虾青素浓度、提高细胞中虾青素含量的金属离子组合 $A_2B_3C_2D_2$ 、 $A_2B_1C_1D_3$ 和 $A_2B_1C_1D_1$,接种培养法夫酵母,培养72 h后取样分析,实验结果如表6。

速增长;48~60 h,法夫酵母7B12处于一个平稳的时期,生物量相对稳定;60~72 h,法夫酵母出现了第2个生长峰,生物量有1个较小的增长,当培养至72 h时,细胞干重最大,达到6.98 g/L,细胞总得率为0.349 g/g 葡萄糖;72 h后,法夫酵母的生物量缓慢下降。24 h以前,发酵液中虾青素的含量基本稳定,增加很少,而细胞内的虾青素浓度还略有下降;24 h~102 h,发酵液及细胞内的虾青素浓度都不断地增高,当培养时间为102 h时,培养液中虾青素浓度(5.31 mg/L)及法夫酵母细胞中虾青素浓度(0.81 mg/g)都达到最大值,虾青素的总得率为0.266 mg/g(葡萄糖)。

3 讨论与结论

3.1 不同金属离子对培养法夫酵母生产虾青素的影响

由图1可知,不同金属离子对法夫酵母具有不同的影响。在培养基中添加 Zn^{2+} 和 Mn^{2+} 能增加细胞干重,而添加其他离子的培养液中细胞干重和空白没有太大区别;在培养基中添加 Zn^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Mn^{2+} 和 Cu^{2+} 能使培养液中虾青素的浓度增加,而添加其他离子的培养液中虾青素的浓度却没有增加;在培养基中添加 Fe^{3+} 和 Cu^{2+} 能使细胞中虾青素的含量增加,而添加其他离子却没有这种效果,这个结果与前人的研究结果相类似^[10]。

3.2 复合金属离子对法夫酵母7B12的影响

正交实验的结果表明,不同金属离子浓度的变化对于法夫酵母的影响有着明显的不同。对于细胞干重来说, Mn^{2+} 浓度的影响最大,而 Fe^{3+} 浓度的影响最小, $A_2B_3C_2D_2$ ($3 \mu mol/L$ 的 Mn^{2+} 、 $5 \mu mol/L$ 的 Zn^{2+} 、 $3 \mu mol/L$ 的 Fe^{3+} 、 $3 \mu mol/L$ 的 Cu^{2+}) 有利于法夫酵母细胞的生长。对于发酵液中虾青素浓度来说, Zn^{2+} 浓度的影响最大,其次是 Fe^{3+} , 再次是 Mn^{2+} , 最小的是 Cu^{2+} , 组合 $A_2B_1C_1D_3$ ($3 \mu mol/L$ 的 Mn^{2+} 、 $1 \mu mol/L$ 的 Zn^{2+} 、 $1 \mu mol/L$ 的 Fe^{3+} 、 $5 \mu mol/L$ 的 Cu^{2+}) 最有利于法夫酵母 7B12 产虾青素。 Zn^{2+} 的浓度对细胞内虾青素浓度的影响最大,其他 3 种金属离子浓度对细胞内虾青素的影响基本相同,组合 $A_2B_1C_1D_1$ ($3 \mu mol/L$ 的 Mn^{2+} 、 $1 \mu mol/L$ 的 Zn^{2+} 、 $1 \mu mol/L$ 的 Fe^{3+} 、 $1 \mu mol/L$ 的 Cu^{2+}) 最有利于法夫酵母细胞内虾青素含量的提高。

验证实验的结果和正交实验的分析结果有一点不同,组合 $A_2B_3C_2D_2$ 、 $A_2B_1C_1D_3$ 分别获得了生物量和发酵液中虾青素浓度的高产,这与预测的结果相似,但 $A_2B_1C_1D_1$ 组合的细胞内虾青素浓度 ($0.74 mg/g$) 却比组合 $A_2B_1C_1D_3$ 的细胞内虾青素浓度值 ($0.75 mg/g$) 低,这和预期的结果有一定的差别。比较 $A_2B_1C_1D_3$ 和 $A_2B_1C_1D_1$ 两组合,唯一的差别就是 Cu^{2+} 浓度的差别, Cu^{2+} 浓度高的金属离子组不仅发酵液中虾青素的浓度最大,而且细胞内虾青素的浓度也最大。这说明 Cu^{2+} 的浓度对发酵液及细胞中虾青素浓度有很重要的影响,这从侧面证实了前人的研究成果^[10]。

3.3 添加复合金属离子批式培养法夫酵母 7B12 的动力学特征

在培养液中添加最有利于虾青素积累的金属离子,生长曲线呈现出明显的二次生长现象,总细胞得率为 $0.349 g/g$ (葡萄糖),总虾青素产率为 $0.266 mg/g$ (葡萄糖);最大细胞浓度为 $6.98 g/L$,发酵液中虾青素的最高含量为 $5.31 mg/L$,细胞内虾青素含量的最高值为 $0.81 mg/g$ 。

参考文献

- 吕玉华,金征宇,徐学明. 虾青素摇瓶发酵条件的研究[J]. 生物技术, 2000 (3): 29~33
- 王菊芳,吴振强,梁世中. 虾青素的生理功能及应用[J]. 食品与发酵工业, 2000, 26(2): 66~69
- 张虹,梁新乐. 虾青素及其他类胡萝卜素的生物合成研究[J]. 郑州工程学院学报, 2002 (3): 70~73
- 徐学明,金征宇,刘当慧,等. 法夫酵母产虾青素的摇瓶工艺[J]. 无锡轻工大学学报, 2000 (3): 230~235
- 梁新乐,岑沛霖,励建荣. 法夫酵母生物合成虾青素的研究[J]. 天然产物研究与开发, 2000 (2): 13~16
- 张龙翔,张庭芳,李今媛. 生化实验方法和技术[M]. 北京: 人民教育出版社, 1997
- 倪辉,何国庆,杨远帆,等. 法夫酵母虾青素分离提取的优化研究[J]. 农业工程学报, 2004, 20(2): 204~208
- 徐学明,金征宇,吕玉华. 发酵法产虾青素的工艺研究[J]. 食品与发酵工业, 2000 (6): 31~36
- 梁新乐,岑沛霖,励建荣,等. 法夫酵母高密度培养及虾青素的高产研究[J]. 菌物系统, 2001 (4): 508~513
- Flores-Cotera L B, Sanchez S. Copper but not iron limitation increases astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* in a chemically defined medium[J]. Biotechnology Letters, 2001(23): 793~797

Studies on Effects of Metal Ions on Astaxanthin Production by *Phaffia rhodozyma*

Ni Hui^{1,2} He Guoqing¹ Yang Yuanfan² Cai Huinong²

1(College of Biosystem Engineering & Food Science, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China)

2(College of Bioengineering, Jimei University, Xiamen 361021, China)

ABSTRACT Single factor comparison experiment and orthogonal experiment were adopted to study the effects of several metal ions on astaxanthin accumulation by *Phaffia rhodozyma* and optimize metal ion composition for the yeast producing astaxanthin. Different metal ion would lead to different results for cultivations of *Phaffia rhodozyma*, Zn^{2+} and Mn^{2+} at low concentration added into the media would lead to increasing biomass. Zn^{2+} , Fe^{3+} , Mn^{2+} and Cu^{2+} at low concentration added into the media would lead to increasing astaxanthin concentration in culture medium. Fe^{3+} and Cu^{2+} at low concentration would lead to increasing astaxanthin concentration in cells. The optimal metal ion content for promoting astaxanthin accumulation gained by orthogonal experiment was composed with $3 \mu mol/L Mn^{2+}$, $1 \mu mol/L Zn^{2+}$, $1 \mu mol/L Fe^{3+}$ and $5 \mu mol/L Cu^{2+}$. In a batch culture of *Phaffia rhodozyma* in the presence of the above optimized metal ion composition, the yield of total cells (d_x/d_s , g/g), product (d_p/d_s , mg/g) and the content of pigment in cell (d_p/d_x , mg/g) were $0.349 g/g$, $0.266 mg/g$ and $0.81 mg/g$, respectively.

Key words metal ion, *Phaffia rhodozyma*, astaxanthin, fermentation